

丝切蛋白在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义

詹建伟¹, 姜支农², 焦德敏³, 宋嘉³, 吴稚冰¹, 陈清勇³

(1. 浙江中医药大学第二临床医学院, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江大学附属邵逸夫医院, 浙江 杭州 310020; 3. 解放军第 117 医院, 浙江 杭州 310004)

摘要: [目的] 探讨丝切蛋白(cofilin)在非小细胞肺癌(NSCLC)组织和不同转移潜能肺癌细胞系中的表达及其临床意义。[方法] 应用 Western blot 法检测肺癌细胞系中 cofilin 蛋白的表达水平。并采用免疫组织化学 SP 法检测 100 例 NSCLC 组织及 30 例癌旁正常组织中 cofilin 的表达。[结果] 高转移性肺癌细胞系中 cofilin 蛋白的表达明显高于低转移性肺癌细胞系。100 例 NSCLC 组织中, cofilin 的阳性表达率为 65%。cofilin 蛋白的表达与 NSCLC 患者的性别、年龄、肿瘤大小、组织类型、临床分期以及病理分级均无关(P 均 >0.05), 仅与有无淋巴结转移有关($P<0.01$)。[结论] cofilin 蛋白在 NSCLC 的生长和转移过程中发挥着重要的调控作用, 可作为判断 NSCLC 转移的重要生物学指标。

关键词: 癌, 非小细胞肺; 丝切蛋白; 肿瘤转移

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)01-0047-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.01.B010

Expression of Cofilin in Non-small Cell Lung Cancer and Its Clinical Significance

ZHAN Jian-wei¹, JIANG Zhi-nong², JIAO De-min³, et al.

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Sir Run Run Shaw Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310020, China; 3. the 117th Hospital of PLA, Hangzhou 310004, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of cofilin in human non-small cell lung cancer tissues (NSCLC) and lung cancer cell lines, and its clinical significance with cancerous metastasis. [Methods] The expression of cofilin protein in lung cancer cell line was detected by Western blot. Cofilin was detected by immuno-histochemical staining SP technique in tumor tissues from 100 lung cancer cases and in carcinoma adjacent tissues from 30 patients. [Results] The expression of cofilin protein up-regulated in highly metastatic human lung cancer. The positive rate of cofilin expression in 100 lung cancer cases was 65%. The up-regulation of cofilin expression significantly correlated with lymph node metastasis, but did not correlate with age, sex, tumor size, histological type, TNM stage and pathological grading. [Conclusion] Cofilin probably plays an important regulating role in the growth and metastasis of lung cancer. Detection of cofilin expression can help in evaluating the metastasis of non-small cell lung cancer.

Subject words: carcinoma, non-small cell lung; cofilin; neoplasm metastasis

肺癌是全世界范围内发病率最高的癌症之一, 我国肺癌发病率和死亡率高居世界首位。丝切蛋白(cofilin)是存在于真核生物中的一种低相对分子质量(21kD)的肌动蛋白结合蛋白, 它通过对肌动蛋白的解聚作用使肌动蛋白纤维能循环使用, 从而保证肌动蛋白纤维能快速聚合和解聚, 改变细胞与细胞外基质的粘附, 促进细胞的运动和迁移。目前, 有关

cofilin 在肺癌中表达与临床病理关系的研究不多, 因此我们采用免疫组化法和 Western blot 法检测 NSCLC 组织和肺癌细胞系中 cofilin 的表达情况, 并进一步分析和探讨它们在 NSCLC 转移中的作用, 为临床判断肺癌患者转移提供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 细胞来源和培养

高转移性肺癌细胞(95D、801D、PG 细胞)、低转

基金项目: 杭州市卫生局医药卫生科技计划项目(2010B039)

通讯作者: 陈清勇, 主任, 主任医师, 硕士研究生, 博士; 解放军第 117 医院呼吸内科, 浙江省杭州市江干区机场路 40 号(310004); E-mail: cqyong117@hotmail.com

收稿日期: 2013-08-29; **修回日期:** 2013-10-14

移性肺癌细胞(95C 细胞)、肺腺癌细胞(A549 细胞)和支气管肺上皮细胞(BEAS-2B 细胞)由解放军第 117 医院呼吸病实验室提供,用含 10%灭活小牛血清的 RPMI 1640 培养液培养并传代。

1.2 临床资料

收集解放军第 117 医院 2003 年 1 月至 2008 年 1 月间经手术病理证实的 100 例原发性 NSCLC 患者的临床资料,其中男性 55 例,女性 45 例;年龄 26~77 岁,平均 47.5 岁。TNM 分期按国际抗癌联盟 1997 年标准判定^[1],Ⅰ期 30 例,Ⅱ期 46 例,Ⅲ期 24 例。腺癌 60 例,鳞癌 40 例。高分化 27 例,中分化 45 例,低分化 28 例。伴淋巴结转移 68 例,不伴淋巴结转移 32 例。30 例癌旁组织(随机)取自远离肿块>3cm 的 NSCLC 患者正常肺组织。

1.3 免疫组化染色

组织标本经 4%甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,免疫组化采用 SP 法,5 μ m 连续切片。鼠抗人 cofilin 试剂盒为 Santa Cruz 公司产品,具体操作步骤按说明书进行。结果判定方法:用 PBS 代替一抗作为阴性对照,已知皮肤正常上皮组织腺体阳性切片作为阳性对照,以细胞膜、细胞浆和(或)细胞核内出现棕黄色颗粒为阳性,先在低倍镜下评价阳性细胞着色强度:无色 0 分,浅黄色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分;再随机选取 5 个高倍镜视野,计数阳性细胞占所观察同类细胞数的百分比,阳性细胞<5%为 0 分,6%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,>75%为 4 分。染色强度与阳性细胞百分比的乘积:0 分为阴性(-),1~4 分为弱阳性(+),5~8 分为中等阳性(++),9~12 分为强阳性(+++)。所有切片均由两位病理科医生在不知道任何临床资料的情况下进行

阅片。

1.4 Western blot 检测

提取各组细胞总蛋白,经 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 1h。一抗为鼠抗人 cofilin(1:1 000),二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(1:10 000)。PVDF 膜依次与抗体作用后再与免疫印迹化学发光试剂反应,后通过化学发光凝胶成像系统进行光密度分析。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析。两因素构成比的差异性检验采用 χ^2 检验,组间均数的比较采用 *t* 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同转移潜能肺癌细胞系和正常人支气管肺上皮细胞中 cofilin 蛋白的表达差异

801D 细胞、95D 细胞和 PG 细胞的 cofilin 蛋白表达水平明显高于 95C 细胞、A549 细胞和 BEAS-2B 细胞,这种差异性表达提示 cofilin 与肺癌的转移相关(Figure 1)。

2.2 cofilin 蛋白在 NSCLC 组织中的表达

在 100 例 NSCLC 组织中,cofilin 阳性表达有 65 例,cofilin 蛋白呈现棕黄色颗粒,主要定位于肿瘤细胞的胞质内,以均匀弥漫分布为主,部分细胞质中可出现粗大棕黄颗粒,在 30 例癌旁组织中,未见 cofilin 蛋白的阳性表达(Figure 2)。

2.3 cofilin 蛋白的表达与 NSCLC 患者临床病理特征的关系

cofilin 蛋白的阳性表达与患者的性别、年龄、肿

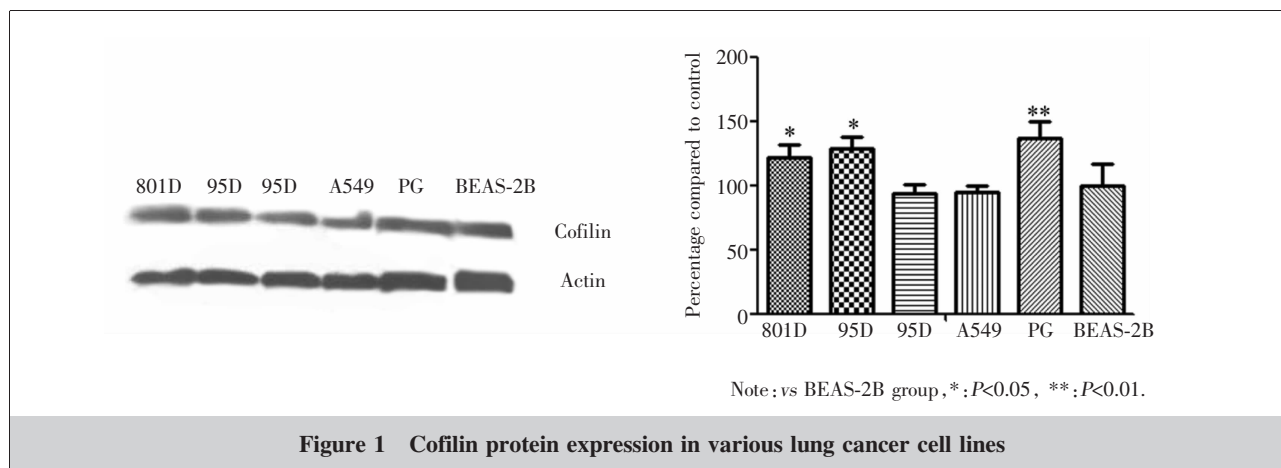


Figure 1 Cofilin protein expression in various lung cancer cell lines

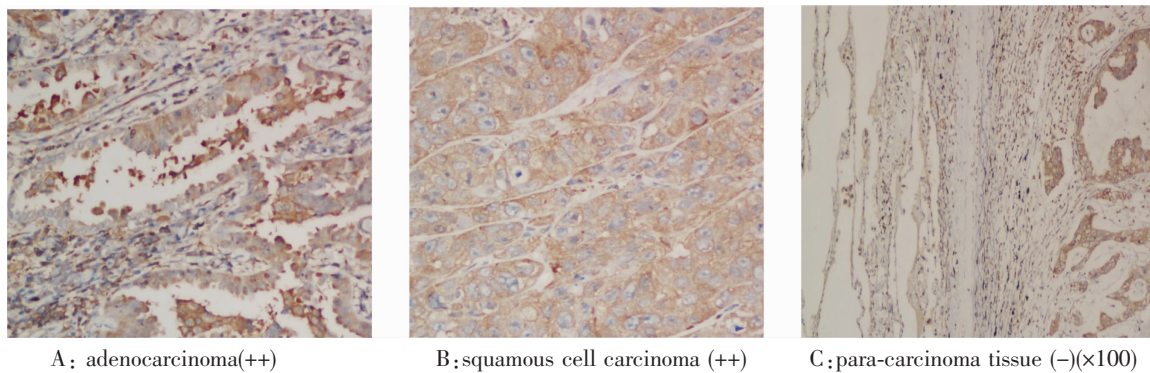


Figure 2 Expression of cofilin by immuno-histochemical staining SP technique (×200)

瘤大小、临床分期、病理分级以及组织类型均无关 (P 均 >0.05),而与患者的淋巴结转移情况有关($\chi^2=12.749, P<0.01$)(Table 1)。

3 讨论

肿瘤的侵袭和转移是一个十分复杂的生物学现象,经过肿瘤细胞从原发肿瘤组织脱离、侵犯周围组织、进入循环系统、逃避免疫监视、血管生成以及在远离肿瘤组织处形成转移灶。在这一过程中,许多肿

瘤转移基因和转移抑制基因参与了调控。

肌动蛋白是真核生物中普遍存在的一种古老的蛋白质,是构成细胞骨架和肌小节的主要成分,执行着重要的生理功能。迄今为止,已经发现多种肌动蛋白结合蛋白(actin-binding protein),其中肌动蛋白解聚因子/丝切蛋白 (actin polymerizing factor/cofilin)被认为有着关键作用。1980年,第一次从鸡脑的胚胎细胞中发现和提纯的 ADF/cofilin,此后这个家族就变成了一个庞大的家族。cofilin 蛋白是丝切蛋白 (cofilin)/肌动蛋白解聚因子 (actin polymerizing

Table 1 Cofilin expression and clinicopathologic feature in lung cancer

Factors	N	Cofilin expression		χ^2	P
		Positive number	Positive rate(%)		
Gender					
Male	55	36	65.5	0.315	>0.05
Female	45	27	60.0		
Age(years old)					
≥ 50	42	25	60.0	0.066	>0.05
<50	58	36	62.5		
Tumor size(cm)					
≥ 3	59	38	64.4	0.010	>0.05
<3	41	26	63.4		
Clinical TNM stage					
I ~ II	76	47	61.8	0.182	>0.05
III	24	16	64.0		
Pathological grade					
High-middle differentiation	72	45	62.5	0.028	>0.05
Poor differentiation	28	18	66.7		
Histological type					
Squamous cell carcinoma	46	29	63.0	0.039	>0.05
Adenocarcinoma	54	33	61.1		
Lymph node metastasis					
+	70	52	74.3	12.749	<0.01
-	30	11	46.7		

factor, ADF) 家族的主要成员, cofilin/ADF 家族的单体与肌动蛋白纤维结合, 通过增加肌动蛋白单体从纤维末端的解离速度及剪切肌动蛋白纤维使之片段化两种方式来加速它们的解聚。

在 cofilin 与肿瘤的关系研究中, 国外很多学者通过应用蛋白质组学及基因芯片等方法检测到许多肿瘤组织和肿瘤细胞中 cofilin 异常高表达, 如口腔鳞癌组织^[2]、肾细胞癌^[3]和卵巢癌^[4]细胞中 cofilin 表达呈现高表达。此外, 在高度侵袭性的 C6 大鼠脑胶质瘤细胞株^[5]、A549 人肺癌株^[6]、人胰腺癌细胞株^[7]和大鼠乳腺癌细胞侵袭亚群中均检测到 cofilin 的高表达^[8]。国内学者吴勇军等^[9]应用组织芯片与免疫组织化学法检测在正常胃黏膜、上皮内瘤变和胃癌组织中的 cofilin 阳性表达率分别为 36.67%、66.67% 和 78.95%, cofilin 与胃癌进展及预后密切相关。郭林林等^[10]认为, 癌症至少在三个方面与 ADF/cofilin 的调控有关, 细胞转化的起始过程、在转移过程中提高细胞的可迁移性和细胞分化。最近一些研究通过小干扰 RNA 技术下调 cofilin 表达可以抑制肿瘤细胞的生长、侵袭与转移, 表明 cofilin 基因可作为肿瘤的靶位基因。这些研究说明, cofilin 蛋白对细胞的运动和形态变化都显示出重要作用, 且与肿瘤细胞侵袭和转移也有密切的关系, 可以作为转移预后的指标及分子靶向治疗的位点。

本研究中, 我们采用 Western blot 法和免疫组化法检测 NSCLC 组织中 cofilin 蛋白的表达情况。在不同转移潜能的肺癌细胞和正常人支气管肺上皮细胞中的检测结果显示, cofilin 蛋白在高转移性肺癌细胞系中的表达高于低转移性肺癌细胞系, 这种差异性表达与 cofilin 蛋白在肺癌组织中的表达一致。免疫组化染色的结果显示, cofilin 蛋白在 100 例 NSCLC 组织中的阳性表达率为 65%, 30 例癌旁组织中均未见 cofilin 蛋白的阳性表达。表明 cofilin 蛋白的异常表达可能是肺癌细胞恶性表型的特征之一。我们还发现, cofilin 蛋白的阳性表达与患者的性别、年龄、肿瘤大小、临床分期、病理分级以及组织类型均无关 (P 均 >0.05), 而与患者的淋巴结转移情况密切相关 ($P < 0.01$)。以上研究结果提示, cofilin 蛋白的异常表达在 NSCLC 的发生、发展和转移过程中发挥着调控作用, 可作为判断 NSCLC 转移的重要生物学指标。这些结果与上述相关文献报道相一致, 其作用

机制可能是 cofilin 通过一系列的激酶和磷酸酶如上皮生长因子 (EGF)、转化生长因子- α 和间质细胞衍生因子 1 (SDF1) 等介导了肌动蛋白的聚合, 从而促进肿瘤的转移和侵袭, 确切机制还有待于进一步的探讨。因此, 控制肿瘤细胞中 cofilin 蛋白的异常表达对临床进行抗肿瘤转移的治疗及判断预后将具有重要的意义。

参考文献:

- [1] Wu HS. The latest TNM classification and system in lung cancer [J]. Chinese Journal of Oncology, 1998, 20(5): 398. [吴怀申. 肺癌最新 TNM 分类和分期[J]. 中华肿瘤杂志, 1998, 20(5): 398.]
- [2] Turhani D, Krapfenbauer K, Thurnher D, et al. Identification of differentially expressed, tumor-associated proteins in oral squamous cell carcinoma by proteomic analysis[J]. Electrophoresis, 2006, 27(7): 1417-1423.
- [3] Unwin RD, Craven RA, Harnden P, et al. Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect[J]. Proteomics, 2003, 3(8): 1620-1632.
- [4] Martoglio AM, Tom BD, Starkey M, et al. Changes in tumorigenesis- and angiogenesis-related gene transcript abundance profiles in ovarian cancer detected by tailored high density cDNA arrays [J]. Mol Med, 2000, 6 (9): 750-765.
- [5] Gunnarsen JM, Spirkoska V, Smith PE, et al. Growth and migration markers of rat C6 glioma cells identified by serial analysis of gene expression[J]. Glia, 2000, 32(2): 146-154.
- [6] Keshamouni VG, Michailidis G, Grasso CS, et al. Differential protein expression profiling by iTRAQ-2DLC-MS/MS of lung cancer cells undergoing epithelial-mesenchymal transition reveals a migratory/invasive phenotype[J]. J Proteome Res, 2006, 5(5): 1143-1154.
- [7] Sinha P, Hütter G, Köttgen E, et al. Increased expression of epidermal fatty acid binding protein, cofilin, and 14-3-3-sigma (stratifin) detected by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing of drug-resistant human adenocarcinoma of the pancreas[J]. Electrophoresis, 1999, 20(14): 2952-2960.
- [8] Wang W, Goswami S, Lapidus K, et al. Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary tumors [J]. Cancer Res, 2004, 64 (23): 8585-8594.
- [9] Wu YJ, Tang Y, Zhang Y, et al. Clinicopathological significance of cofilin1 in gastric cancer tissues [J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2012, 39 (3): 295-298. [吴勇军, 唐仪, 张漾, 等. Cofilin1 在胃癌组织中表达的临床病理意义[J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(3): 295-298.]
- [10] Guo LL, Tang XB. Actin depolymerizing factor/cofilin: actin remodeling protein family[J]. Chemistry of Life, 2005, 25(3): 216-218. [郭林林, 李学宝. 肌动蛋白解聚因子/丝切蛋白: 肌动蛋白重塑蛋白质家系 [J]. 生命的化学, 2005, 25(3): 216-218.]